养血柔筋方联合有氧运动调控 SDF-1/CXCR4 通路对兔膝骨关节炎模型炎症及软骨代谢的影响

李　振[1]，沈锦涛[2]，杨　彬[3]

1. 丽水职业技术学院，浙江丽水　323000；2. 河南省中医院（河南中医药大学第二附属医院）关节科，河南郑州　450053；3. 河南省中医院（河南中医药大学第二附属医院）疼痛科，河南郑州　450053

通信作者：杨　彬，电话：13503866179，电子邮件：byang007@126.com

摘要：目的　探究养血柔筋方联合有氧运动调控基质细胞衍生因子 1（SDF-1）/CXC 趋化因子受体 4（CXCR4）通路对兔膝骨关节炎（KOA）模型炎症及软骨代谢的影响。**方法**　取新西兰兔采用膝关节腔内注射木瓜蛋白酶法建立 KOA 模型，随机分为模型组、养血柔筋方组、有氧运动组、养血柔筋方+有氧运动组、塞来昔布组，每组 10 只，另取 10 只新西兰兔设定为对照组，分组干预治疗后以甲苯胺蓝（TB）染色检测各组兔膝关节软骨组织病理形态并行 Mankin 评分；以扫描电镜检测各组兔膝关节软骨形态；以免疫组织化学染色检测各组兔膝关节软骨组织基质金属蛋白酶 13（MMP13）、Ⅱ型胶原（Col-Ⅱ）表达；以酶联免疫吸附检测（ELISA）法测量各组兔血清与膝关节液中炎症因子白细胞介素（IL）-17、肿瘤坏死因子α（TNF-α）、IL-6、IL-18 水平；以免疫印迹法检测各组兔膝关节软骨组织 SDF-1/CXCR4 通路相关蛋白表达。**结果**　与对照组比较，模型组兔膝关节软骨发生明显损伤，膝关节软骨组织 Mankin 评分及 MMP13 阳性表达、血清与膝关节液 IL-17、TNF-α、IL-6 及 IL-18 水平、软骨组织 SDF-1 及 CXCR4 蛋白表达明显升高（$P<0.05$），Col-Ⅱ阳性表达明显降低（$P<0.05$）；与模型组比较，养血柔筋方组、有氧运动组、养血柔筋方+有氧运动组、塞来昔布组兔膝关节软骨损伤均减轻，膝关节软骨组织 Mankin 评分及 MMP13 阳性表达、血清与膝关节液 IL-17、TNF-α、IL-6 及 IL-18 水平、软骨组织 SDF-1 及 CXCR4 蛋白表达均降低（$P<0.05$），Col-Ⅱ阳性表达均升高（$P<0.05$）；与养血柔筋方组、有氧运动组比较，养血柔筋方+有氧运动组、塞来昔布组兔膝关节软骨损伤均减轻，膝关节软骨组织 Mankin 评分及 MMP13 阳性表达、血清与膝关节液 IL-17、TNF-α、IL-6 及 IL-18 水平、软骨组织 SDF-1 及 CXCR4 蛋白表达均降低（$P<0.05$），Col-Ⅱ阳性表达均升高（$P<0.05$）。**结论**　养血柔筋方和有氧运动可下调 SDF-1/CXCR4 通路蛋白表达，抑制炎症因子表达释放，

基金项目：河南省卫生健康委国家中医临床研究基地科研专项目录（2021JDZX2039）

进而减轻 KOA 兔膝关节炎症，改善兔膝关节软骨代谢，缓解其膝关节软骨胶原降解及组织退变，两者具有协同作用。

关键词：养血柔筋方；有氧运动；SDF-1/CXCR4；膝骨关节炎；炎症；软骨代谢

Effects of Yangxue Roujin Formula Combined with Aerobic Exercise on Inflammation and Cartilage Metabolism in a Rabbit Knee Osteoarthritis Model by Regulating the SDF-1/CXCR4 Pathway

LI Zhen[1], SHEN Jintao[2], YANG Bin[3]

1. Lishui Vocational and Technical College, Zhejiang, Lishui 323000, China; 2. Department of Arthrology, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine (the Second Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine), Henan, Zhengzhou 450053, China; 3. Department of Pain, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine (the Second Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine), Henan, Zhengzhou 450053, China

Corresponding author: YANG Bin, Tel: 13503866179, E-mail: byang007@126.com

ABSTRACT: Objective To investigate the effects of Yangxue Roujin formula combined with aerobic exercise on inflammation and cartilage metabolism in a rabbit knee osteoarthritis (KOA) model by regulating the stromal cell derived factor-1 (SDF-1)/CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) pathway. **Methods** New Zealand rabbits were used to establish a KOA model by injecting papain into the knee joint cavity. They were randomly separated into model group, Yangxue Roujin formula group, aerobic exercise group, Yangxue Roujin formula+aerobic exercise group, and celecoxib group, with 10 rabbits in each group. Another 10 New Zealand rabbits were collected as the control group. After grouping and intervention treatment, toluidine blue (TB) staining was applied to detect the pathological morphology of knee joint cartilage tissue of rabbits in each group and Mankin scoring was performed; scanning electron microscopy was applied to detect the morphology of knee joint cartilage in each group; immunohistochemical staining was applied to detect the expression of matrix metalloproteinase 13 (MMP13) and collagen type II (Col-II) in the cartilage tissue of rabbit knee joints in each group; enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to measure the levels of inflammatory factors such as interleukin-17 (IL-17), tumor necrosis factor-α (TNF-α), IL-6, and IL-18 in the serum and knee

joint fluid of rabbits in each group; immunoblotting was applied to detect the expression of SDF-1/CXCR4 pathway related proteins in rabbit knee joint cartilage tissue in each group. **Results** Compared with the control group, the rabbit knee joint cartilage in the model group was obviously damaged, the Mankin score and MMP13 positive expression in knee cartilage tissue, serum and knee joint fluid IL-17, TNF-α, IL-6, and IL-18 levels, and SDF-1 and CXCR4 protein expression in cartilage tissue were obviously increased ($P<0.05$), the Col-Ⅱ positive expression was obviously reduced ($P<0.05$); compared with the model group, the Yangxue Roujin formula group, aerobic exercise group, Yangxue Roujin formula+aerobic exercise group, and celecoxib group all showed reduced cartilage damage in the rabbit knee joint, the Mankin score and MMP13 positive expression in knee cartilage tissue, serum and knee joint fluid IL-17, TNF-α, IL-6, and IL-18 levels, and SDF-1 and CXCR4 protein expression in cartilage tissue were obviously reduced ($P<0.05$), the Col-Ⅱ positive expression was obviously increased ($P<0.05$); compared with the Yangxue Roujin formula group and the aerobic exercise group, the Yangxue Roujin formula+aerobic exercise group and the Celecoxib group all showed a reduction in rabbit knee joint cartilage damage, the Mankin score and MMP13 positive expression in knee cartilage tissue, serum and knee joint fluid IL-17, TNF-α, IL-6, and IL-18 levels, and SDF-1 and CXCR4 protein expression in cartilage tissue were obviously reduced ($P<0.05$), the Col-Ⅱ positive expression was obviously increased ($P<0.05$). **Conclusion** The Yangxue Roujin formula and aerobic exercise can down-regulate the expression of SDF-1/CXCR4 pathway proteins, inhibit the release of inflammatory factors, thereby reducing knee joint inflammation in KOA rabbits, improving cartilage metabolism, alleviating collagen degradation and tissue degeneration in knee joint cartilage. The two have a synergistic effect.

Key words: Yangxue Roujin formula; aerobic exercise; SDF-1/CXCR4; knee osteoarthritis; inflammation; cartilage metabolism

膝骨关节炎（knee osteoarthritis，KOA）是一种骨关节退行性疾病，膝关节软骨变性、破损、退变是其主要病理特征可引发，膝关节疼痛及活动受限等均极大影响患者运动能力和生活质量[1-2]。软骨代谢紊乱导致的 KOA 患者软骨细胞外基质生成和降解失衡是导致关节软骨变性损伤的重要因素之一，炎性因子过量产生引发的炎症级联反应是引发上述病理改变的主要原因，因此抗炎治疗是改善 KOA 临床症状的常用手段[3-4]。基质细胞衍生因子 1（stromal

cell derived factor-1，SDF-1）可与 CXC 趋化因子受体 4（CXC chemokine receptor 4，CXCR4）结合引起炎症因子过量生成，通过诱发炎症反应参与滑膜炎、类风湿性关节炎等炎性疾病的发病过程，SDF-1 在滑膜炎大鼠滑膜中表达显著升高[5]，且 CXCR4 在类风湿性关节炎者的血清和关节滑液中高度表达并与其临床症状评分正相关[6]，抑制 SDF-1/CXCR4 信号传导可以减弱基质金属蛋白酶 13（matrix metallo proteinases 13，MMP13）表达并促进Ⅱ型胶原（collagen type II，Col-Ⅱ）表达，减轻颞下颌关节骨性关节炎软骨降解及退变损伤[7]，由此可知 SDF-1/CXCR4 是防治 KOA 的潜在作用靶点。中医理论认为瘀血阻滞及肝肾亏虚时 KOA 的基本病机，基于“筋柔骨正”理论进行补肾活血可有效改善膝关节周围供血情况，抑制软骨细胞外基质降解，促使软骨细胞存活增殖及软骨分化，进而减轻 KOA 患者临床症状[8]，养血柔筋方是河南省中医院临床治疗骨关节疾病的验方，可补气血、养筋骨，并滋养肝肾、通经活络，在 KOA 的临床治疗中有较好的疗效[9]；运动是 KOA 的核心疗法之一，包括各种运动方法，均在临床中有所应用[10]，其中有氧运动可有效减轻骨关节炎兔软骨细胞凋亡及损伤[11]，但养血柔筋方联合有氧运动对 KOA 的治疗作用及其机制目前还未有明确研究。本文通过建立兔 KOA 模型，基于 SDF-1/CXCR4 信号探讨养血柔筋方联合有氧运动对其炎症及软骨代谢的影响。

材料和方法

实验动物 新西兰白兔（雌雄各半），3 月龄左右，体重 2 kg 左右，SPF 级，购自北京科宇动物养殖中心，生产许可证号 SCXK（京）2018-0010，在金属笼子里饲养，温度（23±2）℃，湿度（60±5）%，标准饮食。

主要试剂与仪器 木瓜蛋白酶（效价 80 万 u/g，批号 716M022），购自北京索莱宝科技有限公司；养血柔筋方（党参 12 g，生白术 10 g，生薏苡仁 30 g，牛膝 25 g，熟地黄 20 g，当归 12 g，炒白芍 12 g，牡丹皮 12 g，刘寄奴 15 g，菟丝子 9 g，丹参 15 g，独活 12 g，防风 10 g，木瓜 10 g）各药材饮片，购自安徽健诚中药饮片有限公司；塞来昔布（含量 99.5%，批号 140721），购自江苏正大天晴制药有限公司；甲苯胺蓝（toluidine blue，TB）染色试剂盒，购自无锡菩禾生物医药技术有限公司；免疫组化染色试剂盒，购自上海泽叶生物科技有限公司；小鼠源抗兔 Anti-MMP13、Anti-GAPDH、Anti-SDF-1、Anti-Col-Ⅱ、Anti-CXCR4 一抗，购自武汉华美生物工程有限公司；驴抗小鼠二抗（HRP 标记）、兔白细胞介素（interleukin，IL）-17、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor α，TNF-α）、IL-6 及 IL-18 酶联免疫吸附测定（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒，购自英国 Abcam 公司等。

动物实验跑台，型号 DB030，北京智鼠多宝生物科技有限责任公司设备；石蜡切片机，

型号，RM2126，德国 Leica 公司设备；生物光学显微镜，型号 LB102，广州市莱特光电技术有限公司设备；扫描电镜，型号 SIGMA300，德国 ZEISS 公司设备；酶标仪，型号 ELx800，美国 BioTek 公司设备；垂直电泳槽，型号 DYCZ-24EN、通用定时双稳电源，型号 DYCZ-24KF、转印电泳仪，型号 DYCZ-40K，北京六一仪器厂设备等。

KOA 兔模型建立及分组干预治疗 参考文献[9]中膝关节腔内注射木瓜蛋白酶的方法建立 KOA 模型：经耳缘静脉缓慢注射 25 mg/kg 戊巴比妥钠（质量分数为 0.6%）来麻醉新西兰白兔，向其膝关节腔内注射质量分数为 3%的木瓜蛋白酶溶液 0.5 mL，3 d 后再次注射（即每隔 2 d 注射一次），共注射 3 次，第 3 次注射 3 d 后发现兔膝关节肿胀、红肿并发生跛行，表明 KOA 造模成功，随机分为模型组、养血柔筋方组、有氧运动组、养血柔筋方+有氧运动组、塞来昔布组，每组 10 只，另取 10 只新西兰兔设定为对照组。取党参 12 g，生白术 10 g，生薏苡仁 30 g，牛膝 25 g，熟地黄 20 g，当归 12 g，炒白芍 12 g，菟丝子 9 g，刘寄奴 15 g，丹参 15 g，牡丹皮 12 g，独活 12 g，防风 10 g，木瓜 10 g 组成一剂养血柔筋方，根据河南省中医院药房制备方法，加水煮沸、过滤得到生药浓度为 5 mg/mL 的药液备用；塞来昔布溶于生理盐水中制为 2.4 mg/mL 的药液备用；有氧运动治疗方法为：将兔放置在动物实验跑台上跑步，速度为 1.5 km/h，20 min/次[11]。兔 KOA 造模成功进行分组干预治疗：养血柔筋方组兔灌胃 10 mL/kg 上述养血柔筋方药液，使剂量达到 50 mg/kg[9]；有氧运动组兔以方式上述进行有氧运动治疗，同时灌胃 10 mL/kg 生理盐水；养血柔筋方+有氧运动组兔灌胃 10 mL/kg 上述养血柔筋方药液，使剂量达到 50 mg/kg，同时以方式上述进行有氧运动治疗；塞来昔布组兔灌胃 10 mL/kg 上述塞来昔布药液，使剂量达到 24 mg/kg[9]；对照组、模型组兔灌胃 10 mL/kg 生理盐水，各组兔每天灌胃 1 次，每周运动 5 次，均干预治疗 4 周。

标本采集 4 周治疗结束后 24 h 的各组兔以 KOA 兔模型构建中方法麻醉，自其耳缘静脉采集血液，在 4℃下 2000 r/min 离心 10 min，得到各组兔血清保存在-20℃冰柜内备用；向各组兔患侧膝关节腔注射 1.0 mL 生理盐水并来回屈伸膝关节，使其充分活动后抽取关节液，在 4℃下 2000 r/min 离心 10 min，得到各组兔膝关节液保存在-20℃冰柜内备用；自耳缘静脉注入 20 mL 空气来处理各组兔，以手术刀切开患侧膝关节后取胫骨内侧软骨，切下约 0.4 g 软骨组织加入 RIPA 缓冲液，采用组织匀浆机高速研磨后提取其中总蛋白，以 BCA 法测出其浓度后将所得各组兔软骨组织蛋白样品液保存在-20℃冰柜内备用；剩余软骨组织切下约 1 cm×0.5 cm×1 cm 的组织块放入 10%中性组织固定液中固定，取出以 75%、80%、95%、100%的乙醇溶液逐步脱水，二甲苯透明，然后于石蜡（65℃）中进行包埋，石蜡冷凝后制作常规病理切片备用；剩余软骨组织适当修整后于二甲碑酸钠缓冲液内漂洗，取出用

1%四氧化娥固定，再次于二甲碑酸钠缓冲液内漂洗，取出以上述同样方法逐级脱水，然后置于醋酸异戊醋中保存过夜后备用。

以 TB 染色检测各组兔膝关节软骨组织病理形态并行 Mankin 评分　取各组兔膝关节软骨石蜡切片用二甲苯溶液脱蜡后以 100%、95%、80%、75%的乙醇溶液逐级水化，滴加 TB 染液进行染色，完成后将切片置于生物光学显微镜下观察并采集其图像，并参考 Mankin 等[12]评分法对各组膝关节软骨缺损情况进行 Mankin 评分，评分范围为 0～14 分，分值越高表示软骨缺损越严重。

以扫描电镜检测各组兔膝关节软骨形态　取出于醋酸异戊醋保存过夜后的各组兔膝关节软骨组织，以二氧化碳临界点干燥并定向黏附于扫描电镜的载物台上，经真空喷金后进行扫描观察各组兔膝关节软骨形态。

以免疫组织化学染色检测各组兔膝关节软骨组织 MMP13、Col-Ⅱ表达　取各组兔膝关节软骨石蜡切片，进行脱蜡水化处理，进行抗原热修复后进行封闭，分别孵育小鼠源抗兔 Anti-MMP13、Col-Ⅱ一抗（每种抗体孵育 3 张切片）后行免疫组化染色，具体步骤按免疫组化染色试剂盒说明指导进行，完成后将切片置于生物光学显微镜下观察并采集其图像，用图像分析软件 Mage-Pro Plus 6.0 定量计算视野内 MMP13、Col-Ⅱ阳性细胞的平均积分吸光度，以此作为评测 MMP13、Col-Ⅱ阳性表达的标准，值越高表示 MMP13、Col-Ⅱ阳性表达越强。

以 ELISA 法检测各组兔血清及膝关节液中炎症因子 IL-17、TNF-α、IL-6、IL-18 水平　将各组兔血清和膝关节液，于 4℃冰箱中解冻，每组取 420 μL 血清和 420 μL 膝关节液用 ELISA 试剂盒并按其说明书中方法测出其中 IL-17、TNF-α、IL-6、IL-18 水平。

以免疫印迹法检测各组兔膝关节软骨组织 SDF-1/CXCR4 通路相关蛋白表达　取各组兔膝关节软骨组织蛋白样品液，与等体积上样缓冲液混匀后放在 100℃沸水浴中加热变性其中蛋白，每组取 15 μg 总蛋白样品加入上样孔中，在 120 V 恒压下电泳 90 min，取出下部分离胶在 40 mA 稳流下进行湿式转印，膜上蛋白进行封闭后剪下各组 GAPDH、SDF-1、CXCR4 蛋白条带，以一抗、二抗行抗原抗体反应后显色，设置其图片后以软件 Image-Pro Plus 定量各组蛋白灰度值后计算其相对表达（以 GAPDH 内参为基准）。

统计学处理　数据用 SPSS26.0 软件进行统计学分析，同时用平均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）的形式进行描述，多组间及进一步两两之间差异比较进行单因素方差分析、SNK-q 检验，P＜0.05 表示差异有统计学意义。

结　果

养血柔筋方联合有氧运动对各组兔膝关节软骨组织病理损伤的影响 对照组兔膝关节软骨组织形态正常完好，细胞排列整齐；模型组兔膝关节软骨组织出现明显病理损伤：软骨层变薄出现缺损，染色不均且变浅，有深达钙化层的裂隙，软骨细胞结构受损且排列紊乱，与对照组比较，模型组兔膝关节软骨组织 Mankin 评分明显升高（$P<0.05$）；与模型组比较，养血柔筋方组、有氧运动组、养血柔筋方+有氧运动组、塞来昔布组兔膝关节软骨组织病理损伤均减轻，膝关节软骨组织 Mankin 评分均降低（$P<0.05$）；与养血柔筋方组、有氧运动组比较，养血柔筋方+有氧运动组、塞来昔布组兔膝关节软骨组织病理损伤均减轻，膝关节软骨组织 Mankin 评分均降低（$P<0.05$）。见图 1、表 1。

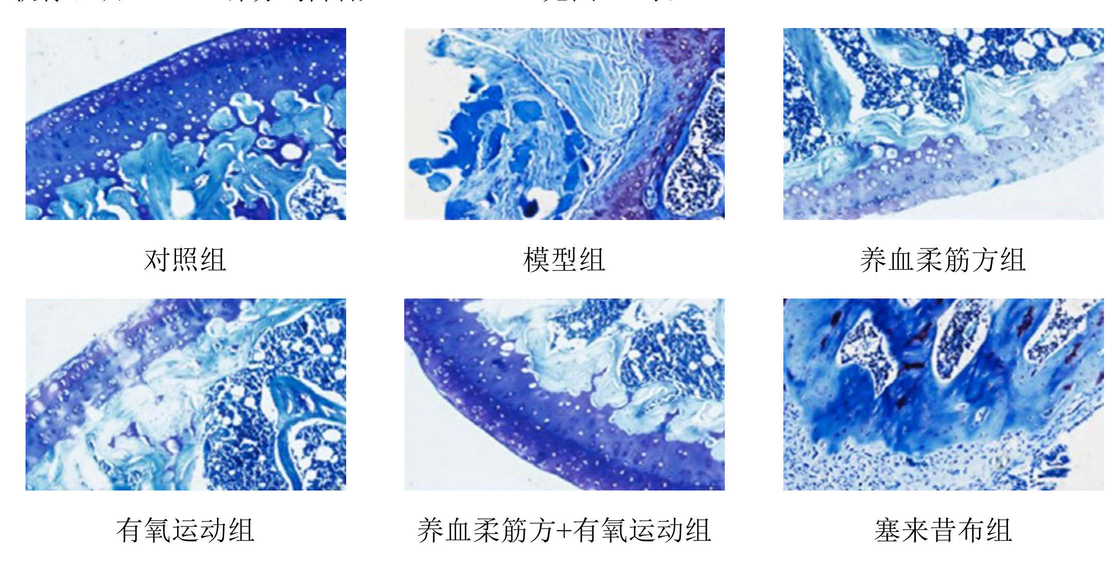


图 1 TB 染色检测各组兔膝关节软骨组织病理形态（×200）

Fig 1 TB staining to detect the histopathological morphology of rabbit knee joint cartilage in each group (×200)

表 1 各组兔膝关节软骨组织 Mankin 评分（n=10，$\bar{x}\pm s$）

Table 1 Mankin score of cartilage tissue of rabbit knee joints in each group (n=10, $\bar{x}\pm s$)

组别	Mankin 评分（分）
对照组	0.00±0.00
模型组	11.30 ± 1.45^{a}
养血柔筋方组	6.40 ± 0.81^{b}
有氧运动组	7.10 ± 1.12^{b}
养血柔筋方+有氧运动组	3.50 ± 0.74^{bcd}
塞来昔布组	3.80 ± 0.65^{bcd}

注：$^{a}P<0.05$ 表示与对照组相比；$^{b}P<0.05$ 表示与模型组相比；$^{c}P<0.05$ 表示与养血柔筋方

组相比；[d]$P<0.05$ 表示与有氧运动组相比。

养血柔筋方联合有氧运动对各组兔膝关节软骨形态的影响　对照组兔膝关节软骨结构正常完整，软骨表面光滑；模型组兔膝关节软骨形态发生损伤：关节软骨表面不光滑并有结晶物附着，软骨变性、坏死、结构变形异常，关节腔表面有大量渗出物出现附着；与模型组比较，养血柔筋方组、有氧运动组、养血柔筋方+有氧运动组、塞来昔布组兔膝关节软骨形态损伤均减轻；与养血柔筋方组、有氧运动组比较，养血柔筋方+有氧运动组、塞来昔布组兔膝关节软骨形态损伤均减轻。见图 2。

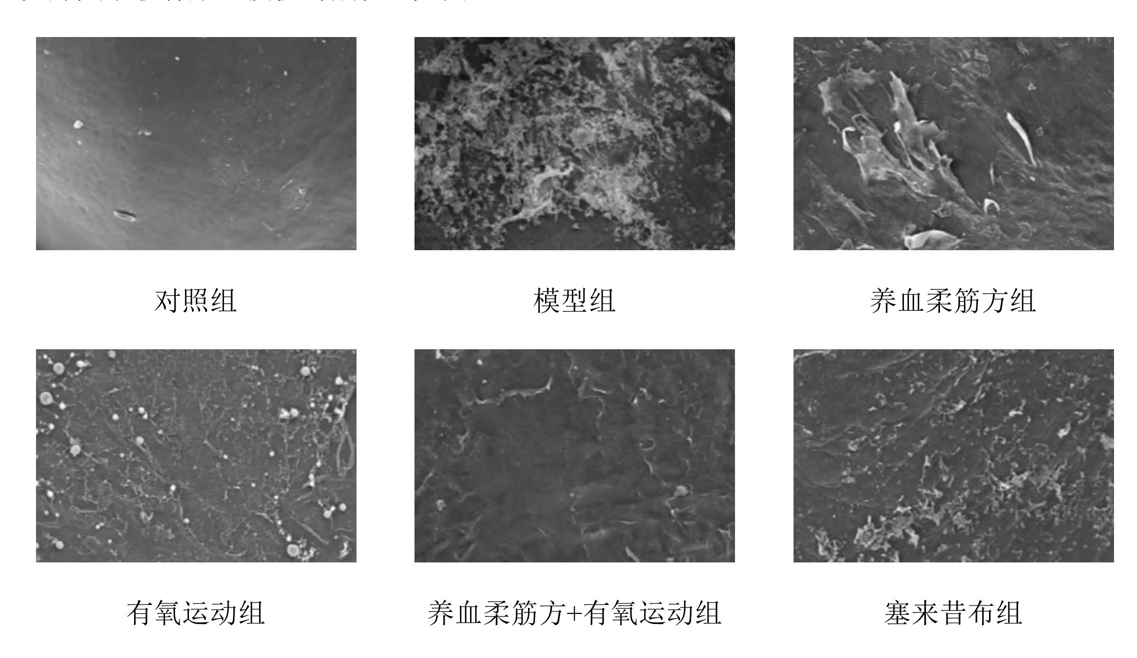


图 2　扫描电镜检测各组兔膝关节软骨形态（×200）

Fig 2　Scanning electron microscopy to detect the morphology of cartilage in the knee joint of rabbits in each group (×200)

养血柔筋方联合有氧运动对各组兔膝关节软骨组织 MMP13、Col-Ⅱ表达的影响　与对照组比较，模型组兔膝关节软骨组织 MMP13 阳性表达明显升高（$P<0.05$），Col-Ⅱ阳性表达明显降低（$P<0.05$）；与模型组比较，养血柔筋方组、有氧运动组、养血柔筋方+有氧运动组、塞来昔布组兔膝关节软骨组织 MMP13 阳性表达均降低（$P<0.05$），Col-Ⅱ阳性表达均升高（$P<0.05$）；与养血柔筋方组、有氧运动组比较，养血柔筋方+有氧运动组、塞来昔布组兔膝关节软骨组织 MMP13 阳性表达均降低（$P<0.05$），Col-Ⅱ阳性表达均升高（$P<0.05$）。见图 3、表 2。

组别	MMP13	Col-Ⅱ

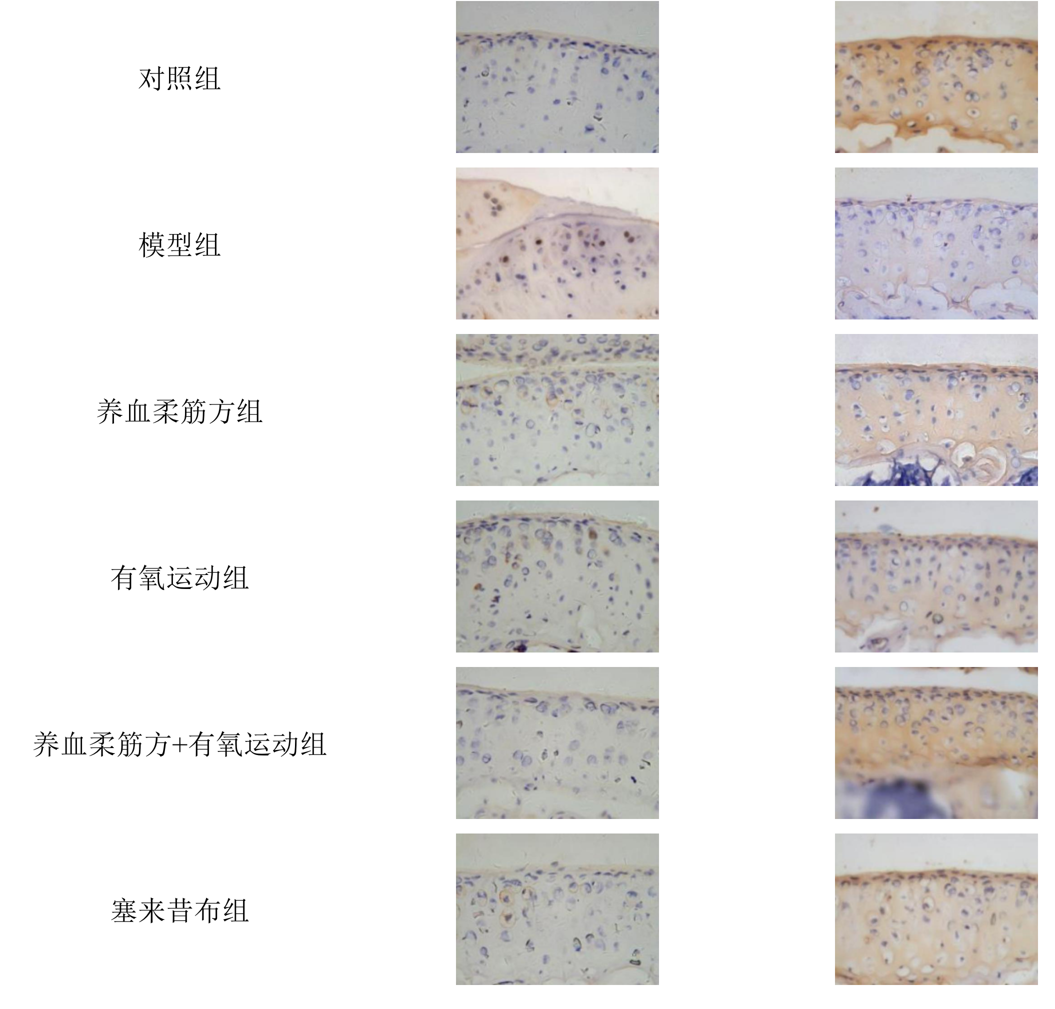


图 3　免疫组织化学染色检测各组兔膝关节软骨组织 MMP13、Col-Ⅱ表达（×200）

Fig 3　Detection of MMP13 and Col-II expression in rabbit knee cartilage tissues by immunohistochemical staining in each group (×200)

表 2　各组兔膝关节软骨组织 MMP13、Col-Ⅱ阳性表达（以平均吸光度表示，n=10，$\bar{x} \pm s$）

Table 2　Positive expression of MMP13 and Col-II in the cartilage tissues of rabbit knee joints in each group (expressed as mean absorbance, n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	MMP13 平均吸光度	Col-Ⅱ平均吸光度
对照组	0.12±0.03	0.62±0.08
模型组	0.47±0.09[a]	0.06±0.02[a]
养血柔筋方组	0.21±0.06[b]	0.39±0.04[b]
有氧运动组	0.27±0.07[b]	0.34±0.05[b]
养血柔筋方+有氧运动组	0.15±0.04[bcd]	0.56±0.07[bcd]
塞来昔布组	0.18±0.05[bcd]	0.54±0.09[bcd]

注：[a]P＜0.05 表示与对照组相比；[b]P＜0.05 表示与模型组相比；[c]P＜0.05 表示与养血柔筋方组相比；[d]P＜0.05 表示与有氧运动组相比。

养血柔筋方联合有氧运动对各组兔血清炎症因子水平的影响　与对照组比较，模型组兔血清 IL-17、TNF-α、IL-6、IL-18 水平明显升高（P＜0.05）；与模型组比较，养血柔筋方组、有氧运动组、养血柔筋方+有氧运动组、塞来昔布组兔血清 IL-17、TNF-α、IL-6、IL-18 水平均降低（P＜0.05）；与养血柔筋方组、有氧运动组比较，养血柔筋方+有氧运动组、塞来昔布组兔血清 IL-17、TNF-α、IL-6、IL-18 水平均降低（P＜0.05）。见表 3。

表 3　各组兔血清炎症因子 IL-17、TNF-α、IL-6、IL-18 水平（n=10，$\bar{x}\pm s$）

Table 3　Serum levels of inflammatory factors IL-17, TNF-α, IL-6, and IL-18 in rabbits of each group (n=10, $\bar{x}\pm s$)

组别	IL-17（ng/L）	TNF-α（ng/L）	IL-6（ng/L）	IL-18（ng/L）
对照组	82.39±14.76	41.65±11.51	50.13±12.25	113.64±20.87
模型组	301.25±23.03[a]	230.42±18.13[a]	212.61±20.34[a]	470.58±31.25[a]
养血柔筋方组	184.26±16.64[b]	130.13±14.62[b]	129.31±14.45[b]	274.95±26.02[b]
有氧运动组	195.01±20.02[b]	141.45±15.85[b]	140.05±18.40[b]	290.13±28.54[b]
养血柔筋方+有氧运动组	90.54±15.72[bcd]	47.12±11.74[bcd]	57.60±13.74[bcd]	121.54±24.06[bcd]
塞来昔布组	98.93±17.90[bcd]	53.24±13.90[bcd]	64.58±14.06[bcd]	130.12±25.93[bcd]

注：[a]P＜0.05 表示与对照组相比；[b]P＜0.05 表示与模型组相比；[c]P＜0.05 表示与养血柔筋方组相比；[d]P＜0.05 表示与有氧运动组相比。

养血柔筋方联合有氧运动对各组兔膝关节液炎症因子水平的影响　与对照组比较，模型组兔膝关节液 IL-17、TNF-α、IL-6、IL-18 水平明显升高（P＜0.05）；与模型组比较，养血柔筋方组、有氧运动组、养血柔筋方+有氧运动组、塞来昔布组兔膝关节液 IL-17、TNF-α、IL-6、IL-18 水平均降低（P＜0.05）；与养血柔筋方组、有氧运动组比较，养血柔筋方+有氧运动组、塞来昔布组兔膝关节液 IL-17、TNF-α、IL-6、IL-18 水平均降低（P＜0.05）。见表 4。

表 4　各组兔膝关节液炎症因子 IL-17、TNF-α、IL-6、IL-18 水平（n=10，$\bar{x}\pm s$）

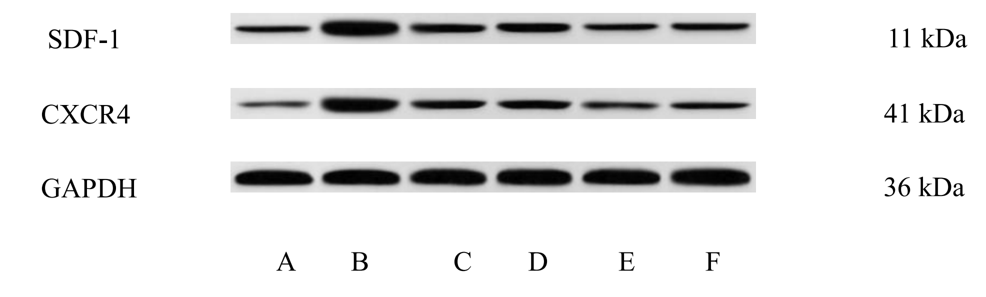
Table 4　Levels of inflammatory factors IL-17, TNF-α, IL-6, and IL-18 in rabbit knee joint fluid of each group (n=10, $\bar{x}\pm s$)

组别	IL-17（ng/L）	TNF-α（ng/L）	IL-6（ng/L）	IL-18（ng/L）

对照组	76.42±15.05	36.69±9.93	44.35±10.57	96.83±17.86
模型组	289.31±24.12[a]	214.47±16.85[a]	197.13±19.36[a]	453.26±26.30[a]
养血柔筋方组	190.96±17.64[b]	109.98±14.02[b]	125.02±16.48[b]	260.82±22.68[b]
有氧运动组	201.35±20.53[b]	122.15±13.04[b]	134.25±15.57[b]	271.30±23.54[b]
养血柔筋方+有氧运动组	83.23±16.15[bcd]	40.92±10.74[bcd]	51.68±11.62[bcd]	102.37±21.23[bcd]
塞来昔布组	89.51±18.06[bcd]	45.03±12.08[bcd]	58.73±12.01[bcd]	110.45±20.01[bcd]

注：[a]$P<0.05$ 表示与对照组相比；[b]$P<0.05$ 表示与模型组相比；[c]$P<0.05$ 表示与养血柔筋方组相比；[d]$P<0.05$ 表示与有氧运动组相比。

隐丹参酮对兔膝关节软骨组织 SDF-1/CXCR4 相关蛋白表达的影响 与对照组比较，模型组兔膝关节软骨组织 SDF-1、CXCR4 蛋白表达明显升高（$P<0.05$）；与模型组比较，养血柔筋方组、有氧运动组、养血柔筋方+有氧运动组、塞来昔布组兔膝关节软骨组织 SDF-1、CXCR4 蛋白表达均降低（$P<0.05$）；与养血柔筋方组、有氧运动组比较，养血柔筋方+有氧运动组、塞来昔布组兔膝关节软骨组织 SDF-1、CXCR4 蛋白表达均降低（$P<0.05$）。见图 4、表 5。



A：对照组；B：模型组；C：养血柔筋方组；D：有氧运动组；E：养血柔筋方+有氧运动组；F：塞来昔布组。

图 4 免疫印迹检测各组兔膝关节软骨组织 SDF-1/CXCR4 信号通路相关蛋白表达

Fig 4 Expression of proteins related to SDF-1/CXCR4 signaling pathway in rabbit knee cartilage tissues of various groups detected by immunoblotting

表 5 各组兔膝关节软骨组织 SDF-1/CXCR4 相关蛋白相对表达（n=10，$\bar{x}\pm s$）

Table 5 Relative expression of SDF-1/CXCR4-related proteins in the cartilage tissues of rabbit knee joints of each group (n=10, $\bar{x}\pm s$)

组别	SDF-1/GAPDH	CXCR4/GAPDH
对照组	0.21±0.05	0.17±0.04

模型组	0.99±0.11[a]	0.94±0.10[a]
养血柔筋方组	0.59±0.08[b]	0.55±0.07[b]
有氧运动组	0.63±0.09[b]	0.59±0.08[b]
养血柔筋方+有氧运动组	0.23±0.06[bcd]	0.19±0.05[bcd]
塞来昔布组	0.25±0.07[bcd]	0.21±0.06[bcd]

注：[a]P＜0.05 表示与对照组相比；[b]P＜0.05 表示与模型组相比；[c]P＜0.05 表示与养血柔筋方组相比；[d]P＜0.05 表示与有氧运动组相比。

讨　论

KOA 是在中老年人群中致残的主要原因之一，近年来随着我国人口老龄化的深入发展，KOA 发病率也逐年增高，已成为我国亟需解决的医疗卫生问题，如今临床中以手术治疗和药物治疗为主，但手术花费巨大且存在后遗症，药物治疗会引发胃、肠道等不良反应及药物依赖，因此需要探究更简便、有效的安全治疗手段[13-14]。本文成功构建兔 KOA 模型，结果显示造模兔膝关节软骨组织出现软骨层变薄出现缺损、染色不均且变浅，软骨细胞结构受损且排列紊乱等病理损伤症状，并存在软骨表面不光滑并有结晶物附着，软骨变性、坏死、结构变形异常，关节腔表面有大量渗出物出现附着等形态损伤现象，且兔发生跛行且膝关节肿胀，表明兔 KOA 模型建立成功。

中医认为 KOA 主要病位在筋，筋骨失衡、血虚血瘀是其病理特点，肝肾虚亏、精血不足引发瘀血不去、经络痹阻是其主要病机，治疗应以平补肝肾、养血活血报维持筋柔骨正为主[8,15]，养血柔筋方中以熟地黄、当归、炒白芍、菟丝子、牛膝为君药，可柔肝补肾、填精养血；以生白术、熟地黄、党参、生薏苡仁为臣药，可理气健脾；以丹参、防风、刘寄奴、独活、牡丹皮为佐能化瘀止痛、祛风除痹、活血通络；共同起到柔筋养肝、补肾养血、活血散瘀的功效，可减轻关节疼痛、软骨退行性病变、膝关节功能受损等 KOA 症状，是治疗早中期 KOA 的有效方剂[16]；有氧运动被认为是治疗 KOA 的有效手段，在临床中有广泛应用，可有效提升 KOA 患者生活质量[17-18]。本文结果显示，以养血柔筋方、有氧运动干预治疗 KOA 兔，均可减轻兔膝关节软骨损伤，降低其膝关节软骨组织 Mankin 评分及 MMP13 阳性表达、血清与膝关节液 IL-17、TNF-α、IL-6 及 IL-18 水平，升高其软骨组织 Col-Ⅱ阳性表达，且两者联合疗效比单独干预更好，表明养血柔筋方、有氧运动均可减少炎症因子生成释放，抑制 KOA 兔关节炎症，改善其软骨代谢，减轻其关节软骨降解与损伤，且两者联合干预具有协同作用。

SDF-1/CXCR4 信号可通过调控炎症、软骨代谢、软骨细胞凋亡及外基质降解等过程介导关节炎疾病的发生发展[6-7]，抑制 SDF-1/CXCR4 信号激活可减少 MMP-3、MMP-9 和 MMP-13 蛋白合成，进而减轻关节炎大鼠软骨损伤[19]，靶向阻断 SDF-1/CXCR4 信号传导可降低 Col-Ⅱ和聚集蛋白多糖的降解，从而延缓关节软骨的变性[20]，因而推测降低 SDF-1/CXCR4 信号活性可能是治疗 KOA 的有效措施。本文结果显示，KOA 兔膝关节软骨组织 SDF-1 及 CXCR4 蛋白表达相比对照组明显升高，以养血柔筋方、有氧运动干预治疗，均可降低 KOA 兔膝关节软骨组织 SDF-1 及 CXCR4 蛋白表达，且两者联合应用对其蛋白表达的降低作用更强，表明 SDF-1/CXCR4 信号参与介导养血柔筋方联合有氧运动对 KOA 兔关节炎症的抑制剂对其软骨代谢的改善作用。

综上所述，养血柔筋方、有氧运动均可下调 SDF-1、CXCR4 蛋白表达，降低炎症因子表达释放水平，进而阻碍炎症发生发展，改善 KOA 兔膝关节软骨代谢，两者联合发挥协同作用，减轻其软骨降解与损伤，抑制 SDF-1/CXCR4 信号激活可能是养血柔筋方联合有氧运动治疗 KOA 兔的作用机制，本文为 KOA 提供了新的临床防治思路，有利于其治疗技术的改进及 KOA 患者关节软骨退变、关节疼痛、活动受限等临床症状的改善。

参 考 文 献

[1] Uritani D, Koda H, Yasuura Y, et al. Factors associated with subjective knee joint stiffness in people with knee osteoarthritis: A systematic review[J]. Int J Rheum Dis, 2023, 26(3):425-436.

[2] Du X, Liu ZY, Tao XX, et al. Research progress on the pathogenesis of knee osteoarthritis[J]. Orthop Surg, 2023, 15(9):2213-2224.

[3] Pinto RF, Birmingham TB, Philpott HT, et al. Changes and associations between gait biomechanics and knee inflammation after aspiration and glucocorticoid injection for knee osteoarthritis[J]. Arthritis Care Res (Hoboken), 2023, 75(8):1764-1772.

[4] Kim SJ, Kim JE, Choe G, et al. Self-assembled peptide-substance P hydrogels alleviate inflammation and ameliorate the cartilage regeneration in knee osteoarthritis[J]. Biomater Res, 2023, 27(1):40-60.

[5] Qi D, Sun S, Han L, et al. Stromal cell-derived factor-1 regulates the secretion of interleukin-1β in the temporomandibular joint of rats with synovial inflammation[J]. J Oral Pathol Med, 2020, 49(9):933-939.

[6] Peng L, Zhu N, Mao J, et al. Expression levels of CXCR4 and CXCL12 in patients with

rheumatoid arthritis and its correlation with disease activity[J]. Exp Ther Med, 2020, 20(3):1925-1934.

[7] Yang J, Li Y, Liu Y, et al. Role of the SDF-1/CXCR4 signaling pathway in cartilage and subchondral bone in temporomandibular joint osteoarthritis induced by overloaded functional orthopedics in rats[J]. J Orthop Surg Res, 2020, 15(1):330-354.

[8] 周沁心, 陈继鑫, 牛朴钰, 等. 基于"筋柔骨正"理论探讨补肾活血法治疗膝骨关节炎[J]. 云南中医学院学报, 2021, 44(4):97-102.

[9] 沈锦涛, 华茂奇, 张北, 等. 由 IL-10/JAK2/STAT3 通路探讨养血柔筋方对兔膝骨关节炎软骨损伤的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29(6):796-801.

[10] 黄铭汝, 陈俊, 陈世益, 等. 膝关节骨性关节炎运动疗法研究进展[J]. 中国运动医学杂志, 2022, 41(4): 320-329.

[11] 崔志勇. 有氧运动对兔骨关节炎软骨细胞凋亡及相关基因蛋白表达的影响[J]. 动物医学进展, 2017, 38(10):82-87.

[12] Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data[J]. J Bone Joint Surg Am, 1971, 53(3):523-537.

[13] Clark GP. Treatment options for symptomatic knee osteoarthritis in adults[J]. JAAPA, 2023, 36(11):1-6.

[14] Meng Z, Liu J, Zhou N. Efficacy and safety of the combination of glucosamine and chondroitin for knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis[J]. Arch Orthop Trauma Surg, 2023, 143(1):409-421.

[15] 朱红, 方樑, 周学平. 国医大师周仲瑛养血活血法治疗骨关节炎经验撷菁[J]. 浙江中医药大学学报, 2021, 45(11):1192-1196.

[16] 王上增, 王禛, 华茂奇. 养血柔筋方治疗早中期膝关节骨性关节炎临床研究[J]. 中医学报, 2020, 35(12):2661-2665.

[17] 程小桂, 扶忠超, 曹伟灵. 有氧运动在膝骨关节炎中的研究进展[J]. 中国医药科学, 2022, 12(19):64-67.

[18] 林剑浩, 侯云飞, 膝骨关节炎运动治疗临床实践指南编写组. 膝骨关节炎运动治疗临床实践指南[J]. 中华医学杂志, 2020, 100(15):1123-1129.

[19] Chen J, Chen N, Zhang T, et al. Rongjin Niantong Fang ameliorates cartilage degeneration by

regulating the SDF-1/CXCR4-p38MAPK signalling pathway[J]. Pharm Biol, 2022, 60(1):2253-2265.

[20] Wang G, Li Y, Meng X, et al. The study of targeted blocking SDF-1/CXCR4 signaling pathway with three antagonists on MMPs, type II collagen, and aggrecan levels in articular cartilage of guinea pigs[J]. J Orthop Surg Res, 2020, 15(1):195-201.